

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-204483

(43)Date of publication of application : 31.07.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12Q 1/48

C12Q 1/68

(21)Application number : 2000-384268

(71)Applicant : F HOFFMANN LA ROCHE AG

(22)Date of filing : 18.12.2000

(72)Inventor : CHANG SHENG-YUNG PAI
SANTINI CHRISTOPHER DAVID

(30)Priority

Priority number : 1999 465491 Priority date : 16.12.1999 Priority country : US

(54) DETERMINATION OF hTERT mRNA EXPRESSION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a reagent, a method and a kit which are used for determining the expression of hTERT mRNA encoding active hTERT protein and improved more than already described method by permitting more exact estimation of telomerase activity.

SOLUTION: This method is a method for determining telomerase activity in a human sample which comprises (a) acting an RNA derived from the human sample on an amplifying reagent comprising a primer pair (here, the above primer pair comprises the first primer complementary to one side of chain in a specific sequence of double strand hERT gene sequence present in a specific exon domain and the second primer complementary or substantially complementary to the other side of chain in the above hTERT gene sequence present in the specific exon domain), (b) carrying out an amplifying reaction, (c) measuring the formation of amplified products and (d) determining the amount of hTERT mRNA contained in the above sample derived from the result obtained on the process (c). The kit for determining hTERT mRNA contained in the human sample is used to detect the presence of the β domain of the hTERT mRNA for diagnosing and prognosing cancer.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.06.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-204483

(P2001-204483A)

(43) 公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/48		1/68	A
1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2000-384268(P2000-384268)
(22) 出願日 平成12年12月18日 (2000. 12. 18)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 4 6 5 4 9 1
(32) 優先日 平成11年12月16日 (1999. 12. 16)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 591003013
エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCH
E AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ-4070バーゼル・グレ
ンツアーヘルストラツセ124
(72) 発明者 シェン-ユン バイ チャン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94107,
サンフランシスコ スイート 819, サー
ド ストリート 300
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 h T E R T m R N A の発現の定量

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 h T E R T m R N A の発現の定量方法の提供。

【解決手段】 (a) ヒト試料由来のRNAを、プライマー対を含んで成る増幅試薬と接触させ (ここで、前記プライマー対は、特定のエキソン内の領域内の、特定の配列の二本鎖 h E R T 遺伝子配列の一方の鎖に相補的な第1のプライマー、及び特定のエキソン内の領域の前記 h T E R T 遺伝子配列の他方の鎖に相補的又は実質的に相補的な第2のプライマーから成る) ; (b) 増幅反応を行い ; (c) 増幅生成物の生成を測定し ; そして (d) 段階 (c) において得られる結果由来の前記試料中の、h T E R T m R N A の量を決定することを含んで成る方法。ヒトの試料中のテロメラーゼ活性の定量方法。ヒトの試料中の h T E R T m R N A の定量するためのキット。ガン診断のため及びガンの予後のための h T E R T m R N A の β 領域の存在の検出への使用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトの試料中のhTERT mRNAを定量する方法であって：

(a) 前記試料由来のRNAを、プライマー対を含んで成る増幅試薬と接触させ（ここで、前記プライマー対は、エキソン7の上流又はエキソン8の下流のいずれかにある領域の、配列番号1である二本鎖hTERT遺伝子配列の一方の鎖に相補的又は実質的に相補的な第1のプライマー、及びエキソン8内の領域の、前記hTERT遺伝子配列の他方の鎖に相補的又は実質的に相補的な第2のプライマーから成る）；

(b) 増幅反応を行い；

(c) 増幅生成物の生成を測定し；そして

(d) 段階(c)において得られる結果由来の前記試料中の、hTERT mRNAの量を決定すること、を含んで成る方法。

【請求項2】 前記の第1のプライマーが、エキソン6内の領域の、前記hTERT遺伝子配列の前記の鎖に、相補的又は実質的に相補的である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記の増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記の第1のプライマーが、SYC1076（配列番号2）又はSYC1118（配列番号5）であり、そして前記の第2のプライマーがSYC1097（配列番号4）である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記の第1のプライマーがSYC1118（配列番号5）であり、そして前記の第2のプライマーがSYC1097（配列番号4）である、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 段階(c)が、前記の増幅生成物に相補的又は実質的に相補的であるプローブを用いて行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 前記プローブが、エキソン7-エキソン8のスプライス部位を含む領域にハイブリダイズする、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記プローブがCS12（配列番号6）である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記プローブが、CS1（配列番号7）、及びCS3（配列番号8）から成る群から選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項10】 ヒトの試料中のテロメラーゼ活性を定量する方法であって：

(a) 前記試料中のhTERT mRNAを、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法を用いて定量し；そして

(b) 段階(a)において得られる結果由来の、前記試料中のテロメラーゼ活性を決定する、ことを含んで成る方法。

【請求項11】 SYC1097（配列番号4）である

プライマー。

【請求項12】 ヒトの試料中の、hTERT mRNAの発現を定量するためのプライマー対であって、エキソン7の上流又はエキソン8の下流のいずれかにある領域の、配列番号1である二本鎖hTERT遺伝子配列の一方に相補的又は実質的に相補的である第1のプライマー、及びエキソン8内の領域の、前記hTERT遺伝子配列の他方の鎖に相補的又は実質的に相補的である第2のプライマーから成るプライマー対。

【請求項13】 前記の第1のプライマーが、SYC1076（配列番号2）又はSYC1118（配列番号5）であり、そして前記の第2のプライマーがSYC1097（配列番号4）である、請求項12に記載のプライマー対。

【請求項14】 ヒトの試料中のhTERT mRNAを定量するためのキットであって、請求項11に記載のプライマーを含んで成るキット。

【請求項15】 ヒトの試料中のhTERT mRNAを定量するためのキットであって、請求項12又は13に記載のプライマー対を含んで成るキット。

【請求項16】 更に、エキソン7-エキソン8のスプライス部分を含む領域に、ハイブリダイズするプローブを含んで成る、請求項15に記載のキット。

【請求項17】 前記プローブがCS12（配列番号6）である、請求項16に記載のキット。

【請求項18】 更に、CS1（配列番号7）及びCS3（配列番号8）から成る群から選択されるプローブを含んで成る、請求項15に記載のキット。

【請求項19】 SYC1118（配列番号5）とSYC1097（配列番号4）とのプライマー対を含んで成り、そしてCS12（配列番号6）のプローブを含んで成る、請求項16に記載のキット。

【請求項20】 ガンの診断のための、hTERT-mRNAのβ領域の存在の検出の使用。

【請求項21】 ガンの予後のための、hTERT-mRNAのβ領域の存在の検出の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、分子生物学及び核酸化学の分野に関する。更に具体的に、それはガン性細胞の存在の指示薬として、活性型のhTERT、テロメラーゼの触媒サブユニットをコードするmRNAの発現を定量するための方法及び試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 テロメラーゼは、RNA依存DNAポリメラーゼであり、テロメア様DNAを合成する。コア酵素は、テロメア様反復の合成のための鋳型をつとめるRNA成分、及び逆転写活性を有する触媒サブユニットから成り、hTERTと称される(hTCS1、hTRT、及びhEST2としても言及される)。

【0003】テロメラーゼ活性のアッセイは、例えば、引用によって本明細書に組入れられる国際特許公開WO 97/15687に記載されている。PCRを基にした、テロメア様反復の増幅プロトコル (TRAP) は、Chang, 1999, in PCR Applications (Innis et al., eds.) Chapter 17, Academic Press, San Diego; Kimet al. 1994, Science 266 : 2011-2015; 及び米国特許第5,629,154号に記載されており、それらは引用によって本明細書に組入れられる。テロメラーゼ活性は、ほとんどのヒトの体細胞において検出されないが、不死化細胞系及びヒトの腫瘍において検出される。組織試料中の上昇したテロメラーゼ活性の検出は、ガン性組織を同定するために使用することができる。

【0004】Nakamura et al., 1997, Science 277 : 955-959において、ヒトテロメラーゼの触媒サブユニット (その中で、hTERTと称される) をコードする遺伝子が同定された。彼等は、hTERTのmRNAがテロメラーゼネガティブ細胞系で発現しなかったが、テロメラーゼポジティブの不死化細胞系で発現したことを報告し、そしてヒト遺伝子由来のmRNAの発現がテロメラーゼ活性と相関していると結論づけた。

【0005】Meyerson et al., 1997, Cell 90 : 785-795において、テロメラーゼの触媒サブユニット (その中で、hEST2と称される) をコードする遺伝子のクローニングが記述され、そして、それが高レベルで、原発性腫瘍、ガン細胞系、及びテロメラーゼポジティブ組織において発現するが、テロメラーゼネガティブ細胞系及び分化したテロメラーゼネガティブ組織で検出不可能であることが報告されている。彼等は、hEST2のmRNAレベルとテロメラーゼ活性との間に、一般的な相関があることを見出したが、彼等はこれら2つの測定値が一定の、予測可能な比率で存在しないことを報告している。すなわち、Meyerson等は、他の機構が、mRNAレベルの調節以外にも、テロメラーゼ活性の制御において重要であるであろうことを推測した。

【0006】Kilian et al., 1997, Human Molecular Genetics 6 (12) : 2011-2019において、ヒトテロメラーゼの触媒サブユニット (その中で、hTCS1と称される) をコードする遺伝子が同定された。彼等は、前記遺伝子が単一コピーで存在するが、それがいくつかの潜在的なタンパク質をうむ複雑なスプライシングパターンで発現することを報告している。いくつかの異なる転写配列変異体が同定された。前記のスプライス変異体を、前記のNakamura等によって報告されたものと本質的に同一の関連配列と比較することによって、彼等は2つのスプライス変異体の欠失、 α と称される36ヌクレオチドの欠失及び β と称される182ヌクレオチドの欠失、並びに3つの異なる挿入を同定した。前記の α 領域の欠失は、小さいフレーム内の12アミノ酸の欠失をもたらすとして報告された。前記の β 領域の欠失は、短くなっ

たタンパク質をコードすることが報告された。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、活性hTERTタンパク質をコードする、hTERTのmRNAの発現の定量のための、試薬、方法、及びキットを提供する。前記の試薬、方法、及びキットは、テロメラーゼ活性のより正確な推計を可能にすることによって、既に記述された方法以上の向上を提供する。

【0008】hTERTのmRNA発現のレベルは、ガンの診断において補助する情報を提供する。多くの正常な体細胞で抑制されているテロメラーゼ活性は、不死の腫瘍細胞で再活性化する。我々は、テロメラーゼ活性が遺伝子発現のレベルで制御され、そしてhTERTのmRNA発現のレベルがテロメラーゼ活性の測定を提供することを確信した。本発明は、テロメラーゼ活性の正確な及び再現性のある測定を、活性hTERTタンパク質をコードするmRNAを選択的に測定することによって提供する。

【0009】前記のhTERT遺伝子は、約35キロベースに及ぶ16個のエキソン及び15個のイントロンから成り、そして1132アミノ酸をコードする。いくつかのスプライス変異体が報告されてきた。我々は、活性hTERTタンパク質をコードするmRNAのスプライス変異体が、前記 β 領域の存在に基づいたhTERTタンパク質の不活性型をコードする、支配的なスプライス変異体から識別することができ、前記の182ヌクレオチドの欠失がエキソン7及びエキソン8を含むことを決定した。本発明の方法は、前記の β 領域を含むhTERTのmRNAのみを選択的に測定し、そしてその結果、本質的に活性hTERTタンパク質をコードするmRNAのみの定量を可能にする。

【0010】本発明の1つの観点は、これまでに観察されていないスプライス変異体の発見であり、ここで具体的には、おそらくエキソン8の欠失に相当する β 領域の一部の欠失があるものである。このスプライス変異体の発生は、hTERTのmRNAの発現に基づいたテロメラーゼ活性の推計において、これまでに認識されていなかった問題を表す。本発明は、これまでに認識されていないこの問題に対する解決方法を提供する。

【0011】本発明の1つの観点は、ヒトの試料中の、hTERTのmRNAを定量するための方法及び試薬に関する。前記方法及び試薬は、主に前記hTERTタンパク質の活性型をコードするmRNAを、選択的に測定し、前記mRNAはテロメラーゼ活性のより正確な代理の測定を提供し、そしてそれによって、ガンの診断における使用のための、向上した標識を提供する。

【0012】本発明の方法は、一方のプライマーが、前記 β 領域の一部であるエキソン8内の配列にハイブリダイズし、そして他方のプライマーが前記 β 領域の外側の、好ましくは前記 β 領域の上流の、エキソン6内の配

列にハイブリダイズするプライマー対を用いて、標的の h T E R T の m R N A 配列を増幅すること、並びに増幅生成物の形成を定量的に検出することを含む。その様なプライマー対は、増幅された m R N A が、主に活性 h T E R T タンパク質をコードする m R N A に相当するという特性を有する。特に好ましい増幅プライマーを以下に記載する。前記の好ましいプライマーは、それらが前記 m R N A 配列の特異的及び有効な増幅を提供することにおいて、特に有利である。

【0013】増幅の検出は、以下に記載する様な様々な方法を用いて行うことができる。好ましい態様において、増幅した h T E R T の m R N A 配列は、プローブのハイブリダイゼーションによって検出される。特に好ましい態様において、増幅した生成物は、少なくとも部分的にエキソン7内の m R N A 配列にハイブリダイズするプローブを用いて検出され、更に好ましくは、前記 m R N A はエキソン7／エキソン8のスプライス部位を含む。その様なプローブは、これから観察されねばならない、エキソン7のみを欠失しているスプライス変異体の検出を可能にするであろう特性を有する。エキソン7を欠失しているスプライス変異体は、前記プローブにハイブリダイズしなかった生成物の成功した増幅によって同定されるだろう。

【0014】本発明の別の観点は、ヒトの試料中のテロメラーゼ活性を検出するための方法及び試薬に関し、これは本発明の前記の方法及び試薬を用いて、h T E R T の m R N A を定量することを含む。本明細書に記載した様に計算した場合、h T E R T の m R N A の量は、テロメラーゼ活性の推計を提供する。本発明は、本質的に活性 h T E R T タンパク質をコードする h T E R T の m R N A のみを測定することによって、テロメラーゼ活性のより正確な推計を提供する。

【0015】本発明の別の観点は、組織試料中のガン性細胞の存在を同定する方法に関し、これは、本発明の前記の方法及び試薬を用いて、前記 h T E R T タンパク質の活性型をコードする、h T E R T の m R N A の増大したレベル又は、同じくはテロメラーゼ活性の増大したレベルを検出することを含む。

【0016】本発明の別の観点は、本発明の方法における増幅プライマー又は検出プローブとして有用なオリゴヌクレオチドに関する。

【0017】本発明の別の観点は、h T E R T の m R N A を定量するために有用な、1又は複数の、本発明の試薬を含んで成るキットに関する。これらのキットは、様々な形態をとる。1つの態様において、本発明のキットはプライマー及び、任意に上述した様なプローブを含んで成る。前記キットはまた、1又は複数の増幅試薬、例えばプライマー、ポリメラーゼ、緩衝液、及びヌクレオシド三リン酸塩を含んで成る。

【0018】本発明の理解を補助するために、いくつか

の用語を以下に定義する。

【0019】“h T E R T タンパク質”の用語は、本明細書で使用する場合、テロメラーゼの触媒サブユニットを意味する。

【0020】“h T E R T”及び“h T E R T 遺伝子”の用語は、前記の h T E R T タンパク質をコードするゲノム核酸配列を意味する。前記遺伝子のヌクレオチド配列は、本明細書で使用する場合、エキソンとして言及されるコード領域、及びイントロンとして言及される、介在している非コード領域、その両方を含んでいる。

【0021】“核酸”及び“ヌクレオチド”の用語は、プライマー、プローブ、及び検出すべきオリゴマー断片を意味し、そしてポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含む）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含む）、及びプリン若しくはピリミジン塩基、又は修飾したプリン若しくはピリミジン塩基の N グリコシドであるポリヌクレオチドの他の型のいずれかに属するであろう。“核酸”と“オリゴヌクレオチド”の用語の間に、長さにおける違いは意図されておらず、そしてこれらの用語は交換可能に使用されるだろう。これらの用語は、前記の分子の一次構造のみを意味する。従って、これらの用語は二本鎖及び一本鎖の D N A、並びに二本鎖及び一本鎖の R N A を含む。

【0022】オリゴヌクレオチドは、例えば適当な配列のクローニング及び制限並びに直接的な化学的合成を含む、いずれかの適当な方法によって製造することができ、例えば Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68 : 90-99 のホスホトリエステル法; Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68 : 109-151 のホスホジエステル法; Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22 : 1859-1862 のジエチルホスホルアミダイト法; 及び米国特許第 4, 458, 066 号の固体支持法の様な方法は、それぞれが引用によって本明細書に組入れられる。合成法の概説は、Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry, 1 (3) : 165-187 に与えられており、これは引用によって本明細書に組入れられる。オリゴヌクレオチドは典型的に、例えば Perkin Elmer (Norwalk, CT) 及び Pharmacia (Piscataway, NJ) から商業的に入手可能な試薬及び器具を用いて合成される。

【0023】“ハイブリダイゼーション”の用語は、相補的な塩基の対合による、2つの一本鎖核酸の二重鎖構造の形成を意味する。ハイブリダイゼーションは、厳密に相補的な核酸鎖間又はわずかな誤対合の領域を含む核酸鎖間で起こることがある。本明細書で使用する場合、“実質的に相補的”の用語は、わずかな誤対合の領域を除き相補的であることを意味し、ここで誤対合した塩基の総数は、約 15 ～ 約 35 のヌクレオチドの長さの配列にとって、わずかに約 3 つである。厳密に相補的な核酸鎖のみがハイブリダイズする条件は、“ストリンジェント”又は“配列特異的”なハイブリダイゼーションの条

件を意味する。実質的に相補的な核酸の安定な二重鎖は、あまりストリンジェントでないハイブリダイゼーションの条件下で達成することができる。核酸技術の業界の者は、例えばオリゴヌクレオチドの長さ及び塩基対の濃度、イオン強度、並びに誤対合した塩基対の発生率を含むいくつかの変量を経験に基づいて考え、二重鎖の安定性を決定することができる。二重鎖の安定性を計算するためのコンピューターソフトウェアは、様々な企業から商業的に入手可能である。

【0024】オリゴヌクレオチドが厳密に相補的な標的配列に対してのみハイブリダイズするであろう、ストリンジェントな、配列特異的なハイブリダイゼーションの条件は、当業界で公知である（例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと。これは引用によって本明細書に組入れられる）。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる温度において異なるだろう。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度及びpHで、特定の配列の熱融点（ T_m ）より5℃以下であることが選択される。 T_m は、（規定のイオン強度及びpHのもと）50%の塩基対が解離した温度である。ハイブリダイズする条件のストリンジェント性を緩めることは、配列の誤対合を許容させ；許容される誤対合の程度は、ハイブリダイゼーションの条件の適当な調整によって調節することができる。

【0025】“プライマー”の用語は、DNA合成の開始の点として働くことができるオリゴヌクレオチドを意味し、これは、核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物の合成が誘導される条件下、すなわち4つの異なるヌクレオシド三リン酸塩及び重合化因子（すなわちDNAポリメラーゼ又は逆転写酵素）の存在下、適当な緩衝液中及び適当な温度で行われる。プライマーは、好ましくは一本鎖のオリゴデオキシリボヌクレオチドである。前記プライマーは、標的配列に厳密に又は実質的に相補的な“ハイブリダイズ領域”を含むだろう。プライマー伸長が十分にストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で行われる、前記プライマーを用いて行う増幅は、特異的な標的配列の選択的な増幅を与える。増幅反応における使用のため、プライマーのハイブリダイズ領域は、好ましくは約15～約35の長さである。プライマーオリゴヌクレオチドは、完全にハイブリダイズ領域から成るか、あるいは増幅生成物の検出、固定化、又は操作を考慮するが、DNA合成の開始点として働く前記プライマーの基本的な性質を変更しない更なる特徴を含むか、そのどちらでもよい。例えば、前記増幅生成物のクローニングを容易にするために、制限酵素開裂部位を含む短い核酸配列は、前記プライマーの5'末端に結合することができる。

【0026】“プローブ”の用語は、適当な条件下、標

的核酸に選択的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを意味する。前記プローブは、前記標的配列に対して厳密に又は実質的に相補的な“ハイブリダイズ領域”を含み、そして多型部位において前記標的配列に対して厳密に相補的であるだろう。前記プローブを用いて、十分にストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下行われるハイブリダイゼーションアッセイは、特異的な標的配列の選択的な検出を可能にする。当業者は通常、与えられたプローブの厳密な相補体が、プローブとして等しく有用であることを認識するだろう。プローブオリゴヌクレオチドは、完全にハイブリダイズ領域から成るか、あるいは前記プローブの検出又は固定化を考慮するが、有意に前記ハイブリダイズ領域のハイブリダイゼーション特性を変更しない更なる特徴を含むか、そのどちらでもよい。例えば、前記プローブのハイブリダイズ領域は、ポリT“尾部”に結合していてもよく、これは逆ドットプロットアッセイにおける使用のため、前記プローブを固体支持体に固定化するために使用される。

【0027】“標的領域”の用語は、解析すべき核酸の領域を意味する。

【0028】当業界の技術の範囲にある、分子生物学及び核酸化学の従来技術は、前記文献において満足に説明されている。例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotides Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds., 1984); Current Protocols in Human Genetics (Dracopoli et al., eds., 1984 with quarterly updates, John Wiley & Sons, Inc.); and a series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)を参照のこと。この全てが引用によって本明細書に組入れられる。本段落、上文及び下文の両方で示した、全ての特許、特許出願、及び刊行物が、引用によって本明細書に組入れられる。

【0029】前記hTERT遺伝子の完全なコード配列のヌクレオチド配列は、ジーンバンクから、受託番号AF015950のもと入手可能であり、そして以下に配列番号1として提供され、5'から3'の配向で示される。前記核酸の1つの鎖のみを表1に示すが、当業者は配列番号1が、二本鎖ゲノム核酸の領域を同定し、そして前記の両方の鎖が、提供した配列情報によって完全に記載されていることを認識するだろう。更に、当業者は発現した前記mRNA配列の配列が、提供した遺伝子配列から得られることを認識するだろう。本明細書で使用する場合、配列番号1に相当するhTERTのmRNAスプライス変異体（すなわち、欠失又は挿入無し）は、“完全長”のmRNAを意味する。

【表1】

h T E R T 遺伝子のコード配列 (配列番号 1)

```

1  gcagcgctgc gtcctgctgc gcacgtggga agccctggcc ccggccaccc ccgcgatgcc
61  gcgcgctccc cgctgccgag ccgtgcgctc cctgctgcgc agccactacc gcgaggtgct
121  gccgctggcc acgtccgtgc ggcgcctggg gcccagggc tggcggctgg tgcagcgcg
181  ggacccggcg gcttccgcg cgctggtggc ccagtgcctg gtgtcgtgc cctgggacgc
241  acggcgcgcc cccgcgcgcc cctcctccg ccagtgtgcc tgcctgaagg agctgggtggc
301  ccgagtgctg cagaggtcgt gcgagcgcg cggaagaac gtgctggcct tcggcttcgc
361  gctgctggac ggggcccgcg ggggcccccc cgaggccttc accactagcg tgcgcagcta
421  cctgcccaac acggtgaccg acgcactgcg ggggagcggg gcgtgggggc tgcctgctgcg
481  ccgctggggc gacgacgtgc tggttcacct gctggcacgc tgcgcgtctt ttgtgctggt
541  ggctccacgc tgcgcctacc aggtgtgcg gccgcgcgtg taccagctcg gcgtgcccac
601  tcaggccccg ccccgccac acgtatgtgg accccgaagg cgtctgggat gcgaacgggc
661  ctggaaccat agcgtcaggg aggcgggggt cccctgggc ctgcagccc cgggtgcgag
721  gaggcgcggg ggcagtgcga gccgaagtct gccgttgccc aagaagccca ggctgagcgc
781  tgcccttgag ccggagcgga cgcccgcttg gcagggtgcc tgggcccacc cgggcagggc
841  gcgtggaccg agtgaccgtg gtttctgtgt ggtgtcacct gccagaccgc ccgaagaagc
901  cacctctttg gaggtgctgc tctctggcac gcgccactcc caccatccg tgggcccga
961  gcaccaagcg gggcccccac ccacatgcg gccaccacgt cccctgggca cgccttgcct
1021  cccggtgtac gccgagacca agcacttccct ctactcctca ggcgacaagg agcagctcgc
1081  gccctccttc ctactcagct ctctgaggcc cagcctgact ggcgctcggg agctcctgga
1141  gaccatctct ctgggttcca ggccctggat gccagggaact ccccgaggt tgcctcgcct
1201  gcccagcgcc tactggcaca tgcggccccc gtttctggag ctgcttggga accacggcga
1261  gtgcccctac ggggtgctcc tcaagacgca ctgcccgctg cgaactgcgg tcacccacgc
1321  agccggtgtc tgtgcccggg agaagcccca gggtctgtg gcggcccccg aggaaggagg
1381  cacagacccc cgtcgcctgg tgcagctgct ccgccagcac agcagccccc ggcaggtgta
1441  cggcttcgtg cgggcctgcc tgcgcgggct ggtgccccca ggctctggg gctccaggca
1501  caacgaacgc cgcttccctca ggaacaccaa gaagttcatc tccctgggga agcatgccaa
1561  gctctcgtg cagzagctga cgtggaagat gagcgtgcgg gactgcgctt ggctgcgcag
1621  gagcccaggg gttggctgtg ttccggcgc agagcaccgt ctgcgtgagg agatccctgg
1681  caagtccctg cactggctga tgagtgtgta cgtcgtcag ctgctcaggt ctttctctta
1741  tgtcacggag accacgtttc aaaagaaacag gctctttttc taccggaaga gtgtcggag
1801  caagtgcga agcattggaa tcagacagca cttgaagagg gtgcagctgc gggagctgtc
1861  ggaagcagag gtccggcagc atcgggaagc caggcccgcc ctgcagacgt ccagactccg
1921  cttcatcccc aagcctgacg ggctgcggcc gatgtgaa acggactacg tgcgtgggagc
1981  cagaacgttc cgagagaa agaggggcga gcgtctcacc tcgagggtga aggcactgtc
2041  cagcgtgctc aactacgagc gggcgcgggc ccccggcctc ctggcgccct ctgtgctggg

```

【表2】

h T E R T 遺伝子のコード配列 (配列番号 1) 続き

```

2101 ccaggacgat atccacaggg cctggcgac cttcgtgctg cgtgtgctgg cccaggaccc
2161 gccgcctgag ctgtactttg tcaaggtgga tgtgacgggc gcgtacgaca ccattcccca
2221 ggacaggctc acggagggtca tcgccaagcat catcaaacc cagaacacgt actgctgctg
2281 tcgttatgcc gtggtccaga aggccgccca tgggcacgtc cgaaggcct tcaagagcca
2341 cgtctctacc ttgacagacc tccagccgta catgacgacg ttcgtggctc acctgcaagg
2401 gaccagcccg ctgagggatg ccgtcgtcat cgagcagagc tcctccctga atgagggcag
2461 cagtggcctc ttcgacgtct tccatcgctt catgtgccac caccgctgc gcattcagggg
2521 caagtccctac gtccagtgcc aggggatccc gcagggtcc atccctcca cgtgctctg
2581 cagcctgtgc tacggcgaca tggagaacaa gctgtttgct gggttcggc gggacgggt
2641 gtcctcgctt ttggtggatg atttcttgtt ggtgacacct caccctccc acgcgaaac
2701 cttcctcagg accctggctc gaggtgtccc tgagtatggc tgcgtggtga actgctggaa
2761 gacagtgggtg aacttccctg tagaagacga ggccctgggt ggcaaggctt ttgttcagat
2821 gccggccccc ggcctattcc cctgggtgctg cctgctgctg gatacccgga ccttggagg
2881 gcagagcgac tactccagct atgcccggac ctccatcaga gccagtctca ccttcaaccg
2941 cggcttcaag gctgggagga acatgcgtcg caaactctt gggtcttgc ggtgtagtg
3001 tcacagcctg tttctggatt tgcaggtgaa cagcctccag acgtgtgca ccaacatcta
3061 caagatccct ctgctgcagg cgtacaggtc tcacgcatgt gtgctgcagc tcccatctca
3121 tcagcaagtt tggagaacc ccacattttt cctgcgcgtc atccctgaca cggcctccct
3181 ctgctactcc atcctgaaag ccaagaacgc agggatgtcg ctgggggcca agggcgccgc
3241 cggccctctg cctcccagg ccgtgcagtg gctgtgccac caagcattcc tgcacaagct
3301 gactcgacac cgtgtcacct acgtgcacct cctggggtca ctcaagacag cccagacgca
3361 gctgagtcgg aagctcccg ggacgacgtc gactgacctg gaggccgag ccaaccggc
3421 actgccccta gacttcaaga ccattcctga ctgatggcca cccctccaca gccaggccga
3481 ggcagacac cagcagccct gtacgcggg gctctacgtc ccaggagagg agggcgggc
3541 cacacccagg cccgcaccgc tgggagtctg aggcctgagt gagtgtttgg ccgaggcctg
3601 catgtccggc tgaaggctga gtgtccggct gaggcctgag cgaagtgtcca gccaaaggct
3661 gagtgtccag cacacctgac gtcttcaatt cccacaggc tggcgctcgg ctccacccc
3721 gggccagctt tccctcaca ggagccggc tccactccc cacataggaa tagtccatcc
3781 ccagattcgc catgttcc ccttcgccc gccctcttt gccctccacc cccaccatcc
3841 aggtggagac cctgaagagg accctgggag ccttgggaat ttggagtgc caaagggtgt
3901 cctgtacac aggcgaggac cctgcacctg gatgggggtc cctgtgggtc aaattgggg
3961 gaggtgctgt gggagtaaaa tactgaatat atgagttttt cagctttgaa aaaaa

```

【0030】前記h T E R T遺伝子の16個のエキソン
は、配列番号1内の以下のヌクレオチド位置に相当す

る。
【表3】

	最初の	最後の	サイズ
エキソン	ヌクレオチド	ヌクレオチド	(ヌクレオチド)
エキソン1	1	274	274
エキソン2	275	1628	1354
エキソン3	1629	1824	196
エキソン4	1825	2005	181
エキソン5	2006	2185	180
エキソン6	2186	2341	156
エキソン7	2342	2437	96
エキソン8	2438	2523	86
エキソン9	2524	2637	114
エキソン10	2638	2709	72
エキソン11	2710	2898	189
エキソン12	2899	3025	127
エキソン13	3026	3087	62
エキソン14	3088	3212	125
エキソン15	3213	3350	138
エキソン16	3351	4015	665

【0031】前記のβ領域は、エキソン7及び8から成る182個のヌクレオチド領域を意味する。β領域のサブライス変異体は、エキソン7及び8が欠失しているサブライス変異体を意味する。

【0032】本発明の定量法において、前記hTERTのmRNAは、本発明のプライマーを用いて増幅され、そして生じた生成物の速度又は量は、開始時の標的のコピー数を計算する方法で測定される。好ましい態様において、前記の増幅はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて行われる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅は、現在当業界で公知であり、米国特許第4,683,195号；第4,683,202号；及び第4,965,188号に記載されており；それぞれ、引用によって本明細書に組入れられる。PCR及び、特に定量的なPCRの方法及び適用を記載している、出版された多くの文献の例は、PCR Applications, 1999, (Innis et al., eds., Academic Press, San Diego), PCR Strategies, 1995, (Innis et al., eds., Academic Press, San Diego)；及びPCR Protocols, 1990, (Innis et al., eds., Academic Press, San Diego)に見出され、これらはそれぞれ、引用によって本明細書に組入れられる。商業的な販売者、例えばPerkin Elmer (Norwalk, CT)は、PCR試薬を販売し、そしてPCRのプロトコルを発行する。

【0033】RNAの増幅は、最初に、例えばウィルスの逆転写酵素を用いて、標的RNAを逆転写し、そして次に、生じたcDNAを増幅することによって行うことができる。更に好ましい態様において、hTERTのm

RNAの増幅は、一緒に、高温逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて行われ、これは米国特許第5,310,652号；第5,322,770号；第5,561,058号；第5,641,864号；及び第5,693,517号に記載されており、いずれも引用によって本明細書に組入れられる(上文のMyers and Sigua, 1995, PCR Strategies の第5章もまた参照のこと)。

【0034】前記のポリメラーゼ連鎖反応は好ましい増幅法であるが、試料中の標的配列の増幅は、上述した標的配列を増幅するために適当な、いずれかの知られている方法によって達成してもよい。適当な増幅法は、鎖置換アッセイ(Walker et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 392-396, Walker et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20 : 1691-1696、及び米国特許第5,455,166号)及び転写に基づく増幅系を含み、これは米国特許第5,437,990号；第5,409,818号；並びに第5,399,491号；転写増幅系(TAS)(Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173-1177)及び自立配列複製(3SR)(Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1874-1878 及びWO92/08800)を含んでおり；これらはいずれも十分な増幅を提供し、その結果、前記の標的配列を検出することができる。増幅法の論評は、Abramson and Myers, 1993, Current Opinion in Biotechnology 4 : 41-47に与えられており、これは引用によって本明細書に組入れられる。

【0035】前記の増幅生成物を定量的に検出するため

の、いずれかの方法を使用することができ、これは例えば、蛍光染料又は標識プローブを用いることを含む。好ましい、プローブに基づく方法及びプローブを使用しない方法は、下文及び例に記載されている。

【0036】プローブに基づく方法が好ましいのは、プローブのハイブリダイゼーションと一緒に使用して、獲得可能な更なる特異性のためである。試料中のプローブと標的核酸配列との間に形成されるハイブリッドを検出するための、適当なアッセイの形式は、当業界で知られており、そして固定標的アッセイ形式、例えばドットプロット形式、及び固定プローブアッセイ形式、例えば逆ドットプロットアッセイを含む。ドットプロット及び逆ドットプロットアッセイ形式は、米国特許第5,310,893号；第5,451,512号；及び第5,468,613号に記載されており、これらはそれぞれ、引用によって本明細書に組入れられる。

【0037】好ましい、プローブに基づく方法において、定量は“TaqMan”又は“5′ヌクレアーゼアッセイ”を用いて行われ、これらは米国特許第5,210,015号；第5,487,972号；及び第5,804,375号；並びにHolland et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 7276-7280 に記載されており、いずれも引用によって本明細書に組入れられる。前記のTaqManアッセイにおいて、増幅した領域内でハイブリダイズする、標識した検出プローブは、増幅の間、反応混合液に加えられる。前記プローブは、プローブがDNA合成のためのプライマーとして働くことを防ぐために修飾される。前記の増幅は、5′から3′へのエキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、例えばTth DNAポリメラーゼを用いて行われる。前記増幅の各合成段階の間、伸長する前記プライマーの下流の標的核酸にハイブリダイズする、あらゆるプローブが、DNAポリメラーゼの5′から3′へのエキソヌクレアーゼ活性によって減成する。従って、新規の標的鎖の合成もまた、プローブの減成をもたらし、減成生成物の蓄積は、標的配列の合成の測定を提供する。

【0038】減成生成物を定量的に検出するために適当ないずれかの方法を、前記のTaqManアッセイに使用することができる。好ましい方法において、前記の検出プローブは、2つの蛍光染料で標識され、このうちの一方が、他の染料の蛍光を消光することができる。前記の染料は前記プローブに付着し、好ましくは一方が5′末端に付着し、そして他方が内部の部位に付着し、その結果、前記プローブがハイブリダイズしていない状態にある場合に消光が起こり、そして前記DNAポリメラーゼの5′から3′へのエキソヌクレアーゼ活性による前記プローブの開裂は、前記の2つの染料間において起こる。増幅は、消光の除去を伴う、前記染料間のプローブの開裂、及び最初に消光した染料から観察可能な蛍光の増大をもたらし、減成生成物の蓄積は、反応蛍光の増大

を測定することによって監視される。米国特許第5,491,063号及び第5,571,673号は、共に引用によって本明細書に組入れられ、これらは増幅と一緒に起こるプローブの減成を検出するための、別の方法を記載している。

【0039】本明細書で反応的 (kinetic) PCR法として言及され、反応混合液中での二本鎖DNAの合計量における増大を監視することにより増幅した核酸の増大を測定するための、別の、プローブを使用しない方法が、Higuchi et al., 1992, *Bio/Technology* 10 : 413-417 ; Higuchi et al., 1993, *Bio/Technology* 11 : 1026-1030 ; Higuchi and Watson, in PCR Application, Supra, Chapter 16 ; 米国特許第5,994,056号；並びに欧州特許公開第487,218号及び第512,334号に記載されており、それぞれが引用によって本明細書に組入れられる。二本鎖の標的DNAの検出は、臭化エチジウム (EtBr) 及び他のDNA結合染料が、二本鎖DNAに結合したときに示す、増大した蛍光に依存する。標的配列の合成から生じる二本鎖DNAの増大は、二本鎖DNAに結合した染料の量の増大及び付随の検出可能な蛍光の増大をもたらす。

【0040】未知の数の標的配列を含む試料の定量は、典型的に、知られている量の範囲にある標的配列を含む試料の、一連の増幅から作製した“標準曲線”に関して行われる。前記の標準曲線は、増幅の間に生じたシグナル由来の、投入したコピー数を計算するために使用される。従って、注目の試料中の、未知の標的配列のコピー数は、前記の標準曲線を用いて、あらかじめ観察されるものに等しいシグナルを生じることが決定されたコピー数を計算することによって推計される。次に、前記試料中の標的配列の濃度を、反応前に決定する投入コピー数及び試料のサイズから計算する。

【0041】定量的な推計は、投入した試料のサイズ又は反応効率における変化量に影響を受けやすいことがある。前記の投入した試料のサイズの反応間の、計算したhTERT濃度に対する影響は、コントロール遺伝子を用いることによって排除することができる。例に記載した様に、コントロール遺伝子は選択されて、試料中のRNAの量の、独立した測定を提供する。hTERTのmRNAの計算した濃度は、試料のサイズの独立した測定に基づいて調整される。

【0042】前記の標準曲線を作製するために使用する反応と、注目の試料をアッセイするために使用する反応との間の、増幅効率における変化量は、前記標準曲線の適用可能性に影響を及ぼすことがある。標準曲線を作製するために使用する反応を、注目の試料をアッセイするために使用する反応と同時にを行い、増幅試薬の同一の“マスターミックス”を、好ましくは同一のサーマルサイクラー中の隣接した穴で用いることは、効率における反応間の変化量を最小化するだろう。あるいは、内部標

準は、増幅効率の変化量を説明するための結果を調節するために使用することができる。

【0043】前記の標準曲線を作製するために使用する反応と、注目の試料をアッセイするために使用する反応との間の、反応効率の反応間の変化量の影響は、内部標準を用いて排除することができる。前記の内部標準は、知られているコピー数で反応液に加えられ、そして h T E R T の m R N A 標的と一緒に増幅される。知られている量の内部標準から生成したシグナルは、反応効率における差異を説明するための、推計したコピー数を調節するために使用することができる、全体の反応効率の指標を与える。

【0044】内部標準を用いる、増幅を基にした定量法は、米国特許第 5, 219, 717 号及び第 5, 476, 774 号、並びに Wang and Mark, 1990, PCR Protocols に記載されており、これらはそれぞれ引用によって本明細書に組入れられる。前記の内部標準は、前記の標的に存在する同一のプライマー結合部位を含むヌクレオチド配列であり、それは同一のプライマー対によって増幅するが、長さ又は、好ましくは特徴的な内部配列の存在、そのいずれかによって、前記の標的配列から識別できるようなものである。前記の内部標準は、知られているコピー数での、注目の試料の増幅を含み、そして前記の標的配列とほぼ同じ効率で増幅する。前記標準曲線から予想されるシグナルに関する、前記内部標準の増幅によって生成したシグナルのいずれかの変化は、全体の反応効率における変化を反映し、そして前記標的配列のコピー数の推計を調節するために、相応じて使用される。

【0045】増幅反応の混合液は、典型的に室温で会合し、穴はプライマーのハイブリダイゼーション特異性を保証するために前記の温度以下であることを必要とする。非特異的増幅は、室温で前記プライマーが、他の、わずかに部分的に相補的な核酸配列に、非特異的に結合することがあるので、不所望の核酸配列の合成を招き、そして開始することがある。これらの新規に合成され、不所望の配列は、増幅反応の間、所望の標的配列と競合することがあり、そして有意に所望の配列の増幅効率を減少させることがある。

【0046】様々な方法が、増幅反応の特異性を増大させるために記述されてきており；好ましい方法は欧州特許出願第 0 866, 071 号及び同時係属米国出願第 09/039, 866 号に記載されており、これらは共に、引用によって本明細書に組入れられる。それらの中に記載されている様に、1 又は両方の前記増幅プライマーを、3' 末端又はその近傍で、ヌクレオチドのエキソサイクリックアミンへの、修飾因子群の共有結合によって修飾することができる。

【0047】RNA の増幅に適した試料の調製法は、当業界で公知であり、そして本明細書に列記した文献に十分に記載されている。使用する特定の手法は、本発明の

不可欠な部分ではない。適当な方法の例は、本明細書の例に記載されている。当業者は、知られている試料の調製法を用いる使用のため、反応条件を最適化することができる。

【0048】本発明の方法において、標的領域は、エキソン 8 内でハイブリダイズするプライマー及び、エキソン 7 の上流又はエキソン 8 の下流のいずれかでハイブリダイズするプライマーを含んで成るプライマー対を用いて増幅される。その様なプライマーの使用は、活性 h T E R T タンパク質をコードする h T E R T の m R N A に対する向上した特異性を提供し、そしてその結果、h T E R T の m R N A 発現のレベルに基づいたテロメラーゼ活性の推計を向上させる。必要なハイブリダイゼーションの基準を満足させるプライマー対は、配列番号 1 として与えられる配列に基づき設計される。

【0049】好ましくは、標的領域はエキソン 8 内でハイブリダイズするプライマー、及びエキソン 7 の上流でハイブリダイズするプライマーを含んで成るプライマー対を用いて増幅される。我々は、エキソン 7 の上流でハイブリダイズするプライマーの、エキソン 8 内でハイブリダイズするプライマーと一緒に使用が、h T E R T の m R N A の特に効率的な増幅を提供しやすいことを発見した。

【0050】特に好ましいプライマー対は、上流のプライマー、S Y C-1118 (配列番号 5) (エキソン 6 内の、2311~2325 位の配列にハイブリダイズする)、及び下流のプライマー、S Y C1097 (配列番号 4) (エキソン 8 内の、2489~2506 位の配列にハイブリダイズする) から成る。これらのプライマーのヌクレオチド配列を、本明細書の例に与える。これらのプライマーは、h T E R T の m R N A の特に効率的な及び特異的な増幅を可能にする。これらのプライマーの特異性が、定量的なアッセイで有利であるのは、それが、関連配列への、前記プライマーの誤ったプライミングから生じる、非標的配列の増幅によってもたらされる、あらゆる競合的な阻害を排除するためである。同様に、好ましいプライマー対は典型的に、プライマー二量体として知られる、鋳型独立的な非特異的増幅生成物の形成を最小化する。

【0051】本発明の 1 つの態様において、前記の増幅した核酸配列は、適当にストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で、標識オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによって検出される。特定のプローブ配列は、本発明の必須の観点ではない。特定の標的配列に特異的な、及び特定のアッセイの形式における使用に適当なプローブの設計は、当業界で公知である。

【0052】本明細書に記載の T a q M a n アッセイ形式における使用のための、適当なオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは約 15~約 50 ヌクレオチドの長

さであり、更に好ましくは約25～約35ヌクレオチドの長さである。プローブ標的配列のハイブリダイゼーション二重鎖のT_mは、好ましくはプライマー標的配列のハイブリダイゼーション二重鎖のT_mよりも、約5℃～約10℃高い。他の、プローブを基にしたアッセイの形式において、有意により長いプローブも使用することができる。プローブは、前記の増幅領域内の、hTERTのmRNAに厳密に又は実質的に相補的な領域を含んで成る（又は領域から成る）。

【0053】好ましい態様において、前記プローブは、少なくともエキソン7の一部を含む領域、更に好ましくはエキソン7-エキソン8のスプライス部位を含む領域にハイブリダイズする。その様なプローブの使用は、エキソン7のみの欠失に相当するスプライス変異体の識別を可能にする。この特定のスプライス変異体は観察されなかったが、その様なスプライス変異体に対しての識別が可能なプローブの使用は、測定したmRNAが活性hTERTに相当するという更なる保証を提供する。

【0054】特に好ましいプローブ配列は、本明細書の例に記載する。プローブの相補鎖が典型的に、プローブとしても有用であることが理解されるだろう。

【0055】上述した、プローブに基づくアッセイの形式は、典型的に検出を容易にする標識オリゴヌクレオチドを利用する。オリゴヌクレオチドは、分光學、光化学、生化学、免疫化学、又は化学的な手段によって検出可能な標識を組み込むことによって標識することができる。有用な標識は、放射性標識、例えば³²P、蛍光染料、高電子密度試薬、酵素（一般にELISAで使用されるもの）、ビオチン、又はハプテン及び抗血清若しくはモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質を含む。本発明の標識オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを合成するために上述した技術を用いることで、合成して、そして標識することができる。

【0056】本発明はまた、本発明の方法を実施するための、有用な構成要素を含んで成るキットに関する。有用なキットはオリゴヌクレオチドプライマー及び、任意に、本明細書に記載のhTERTのmRNAの、標的領域に特異的なプローブを含んでいてもよい。前記キットの、他の任意の構成要素は、例えば、プライマー伸長生成物の合成を触媒する薬剤、基質のヌクレオシド三リン酸塩、標識に使用する手段（例えば、標識がビオチンならば、アビジン-酵素複合体及び酵素の基質及び色素原）、PCR又はハイブリダイゼーション反応に適した緩衝液、及び本発明の方法を実行するための器具、を含む。

【0057】下文に提示する本発明の例は、例示的な目的のためだけに提供され、そして本発明の範囲を限定するものではない。本件の例に続く特許請求の範囲内にある、本発明の多くの態様は、前文及び下文の例を読むことによって、当業者に明らかであるだろう。

【0058】

【実施例】例1

hTERTのmRNAの定量のための、試料調製プロトコール

以下のプロトコールは、hTERTのmRNAの定量における使用のための、ヒト試料由来の全RNAの調製に適している。

【0059】調製に続いて、前記試料中の全RNA濃度が、典型的に光学密度を260ナノメートルの波長（OD₂₆₀）で、標準的なプロトコールに従い測定することによって決定される。あるいは、前記試料中の全RNA濃度は、Ribogreen（商標）定量キット（Molecular Probes, Eugene, OR）を用いて決定することができる。前記試料は、増幅前に所望の濃度に希釈される。本明細書に記載の増幅において、好ましくは約100～200ngの全RNAが使用される。臨床的な試料、例えば尿由来の全RNAの定量は、最初に確かめるのは困難であるかもしれない。前記試料中の全RNA濃度を、スタンダードとして別の遺伝子を用いることによって推計する方法を、以下に記載する。

【0060】A. 細胞系

全RNAをTel-Test, Inc. (Friendswood, TX)のRNAzol（商標）を用いて、細胞系から調製することができる。以下の例のプロトコールは、約10⁷細胞を含んで成る試料に適している。

- 1) 2mlのRNAzol（商標）中で再懸濁し、ホモジエナイズする。
- 2) 0.2mlのクロロホルムを加え、15秒間はげしく振盪し、氷上で5分間インキュベートする。
- 3) 12,000g、4℃で15分間遠心する。
- 4) 水層を新しい管に移す。
- 5) 等量のイソプロパノールを加え、そして4℃で15分間保存する。
- 6) 12,000g、4℃で15分間遠心する。
- 7) 上清を除く。
- 8) 1mlの70%エタノールを沈澱に加える。
- 9) 12,000g、4℃で15分間遠心する。
- 10) 上清を完全に除く。
- 11) 沈澱を簡単に乾燥させる。
- 12) RNAアーゼを含まないH₂O中で再懸濁する。

【0061】B. 組織

全RNAは、High Pure（商標）RNA組織キット（Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN）を用いて、取扱説明書に従い、組織から調製することができる。

【0062】C. 尿

- 1) 50mlの尿を回収する。
- 2) 直ちに、1,000g、室温で10分間遠心する。
- 3) ピペットを用いて完全に、及び沈澱を乱すことなく慎重に、上清を除く。

- 4) 50ml以下のPBS (Ca⁺⁺及びMg⁺⁺を含まない、滅菌済みの、室温の、Dulbeccoのリン酸緩衝塩溶液)を沈澱に加える。
 5) おだやかに混合する(ボルテックスしない)。
 6) 1,000g、室温で10分間遠心する。
 7) ピペットを用いて、慎重に上清を除く。
 8) 1~1.5mlのPBSを管に残す。
 9) おだやかに混合する(ボルテックスしない)。
 10) 懸濁液を、1.5mlのEppendorf管に移す。
 11) 1,000g (Eppendorf Microfugeで3,500rpm)、室温で2分間遠心する。
 12) ピペットを用いて完全に、及び沈澱を乱すことなく慎重に、上清を除く。
 13) 沈澱を、200μlのPBS中で再懸濁し、そして400μlのHigh Pure溶解用緩衝液を加える。
 14) ピペットのチップを用いて、おだやかに混合する。
 15) 直ちに-70℃で保存する。
 16) High Pure (商標) RNA単離キット

SYC1076 (配列番号2)
 SYC1078 (配列番号3)
 【0066】上流プライマー、SYC1076 (配列番号2)は、エキソン6内の、2309~2325位の配列にハイブリダイズする。下流プライマー、SYC1078 (配列番号3)は、エキソン9内の、2615~2631位の配列にハイブリダイズする。これらのプライマーと一緒に、完全長のhTERT mRNA配列のβ領域を含む、323ヌクレオチドの生成物の増幅を触媒する。

【0067】増幅

それぞれのPCR増幅は、100μlの合計反応液量で行った。最終試薬濃度を以下の様にした：

- 100ng 試料RNA
 50mM Bicine, pH8.2
 125mM KOAc
 8% グリセロール

サーマルサイクリングの時間及び温度

- 反応前のインキュベーション： 50℃で2分間
 95℃で1分間
 逆転写： 62℃で30分間
 60サイクル： 変性： 95℃で20秒間
 アニール／伸長： 60℃で30秒間
 最終伸長及び維持： 72℃

【0070】ゲル電気泳動的検出

増幅反応生成物(5μl)は、アガロースゲル電気泳動によって解析した。3% Nusieve GTG及び、0.5μg/mlの臭化エチジウム (Cal Biochem, La Jolla, CA)を含む0.5%アガロース (FMC Bio Pr

(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)を用いて、全RNAを調製する。

【0063】例2

新規スプライス変異体の同定

これまでに観察されていないスプライス変異体が、前記β領域と接するプライマーを用いたhTERT mRNAの増幅及び、ゲル電気泳動による増幅生成物の解析によって同定された。

【0064】試料

- 10 増幅は、以下の試料を用いて行った：

1. 全hTERT遺伝子をコードする配列を含む転写プラスミドから調製した、hTERTポジティブのコントロールmRNAの、連続希釈溶液。
2. Clontech (Palo Alto, CA) から購入した、ヒト胸腺細胞由来の全RNA。
3. 例1に記載のプロトコールに従い調製した、白血病細胞系(K562)由来の全RNA。

【0065】増幅プライマー

- 前記のhTERT mRNA領域の増幅は、5' から
 20 3' の配向で示す、以下のプライマーを用いて行った：

5' -CATGGGCACGTCCGCAA-3'

5' -CGCCGAATCCCCGCAA-3'

4mM Mn(OAc)₂

200μM dATP, dGTP, dCTP

400μM dUTP

200nM 各プライマー

1μg/ml 臭化エチジウム

2ユニット UNG*

30 10ユニット rTth DNAポリメラーゼ*

* Hoffmann-La Roche によって開発及び製造をされ、そしてPerkin Elmer (Norwalk, CT) から入手可能なもの。

【0068】増幅反応は、Gene Amp PCRシステム9600サーマルサイクラー (Perkin Elmer, Norwalk, CT)で行い、使用した特異的な温度周期を以下に示す。

【0069】

oducts, Rockland, ME)ゲルを、0.5μg/mlの臭化エチジウムを含む、1×TBE (89mMTris-ホウ酸及び2.5mM EDTA2ナトリウム、pH8.3)のランニング緩衝液を用いて使用した。電気泳動は、100ボルトで約1時間行った。前記のゲルは、水の中で簡単に

脱色し、そして臭化エチジウムで染色したDNAのバンドは、UV照射を用いて可視化した。

【0071】pBR322/Msp1分解ラダー (New England Biolabs, Beverly, MA) を、サイズマーカー

レーン番号	試料
1	pBR322/Msp1分解ラダー
2, 3	2×10^6 コピーのhTERTポジティブコントロールRNA
4, 5	2×10^5 コピーのhTERTポジティブコントロールRNA
6, 7	100ngの胸腺RNA
8, 9	100ngのK562 RNA
10, 11	鋳型無しのコントロール

【0073】全hTERTのコード配列を含む、ポジティブコントロールmRNAの増幅は、レーン2～5に見られる様に、単一の増幅生成物をもたらした。

【0074】胸腺、レーン6～7、及びK562、レーン8～9の増幅は、3つの異なるサイズの、hTERT mRNAのスプライス変異体に相当する3つの特異的バンドをもたらした。観察される最大の生成物は、完全長のhTERT mRNAのスプライス変異体の増幅からもたらされ、これはレーン2～5における増幅生成物の比較によって見ることができる。最小の生成物は、β欠失スプライス変異体の増幅から予想される、141ヌクレオチドの生成物に相当する。中間のバンドは、これまで見られなかったスプライス変異体の増幅から生じた。前記バンドのサイズは、エキソン7が欠失している生成物に相当する。

【0075】鋳型を含まないコントロールの増幅は、同一のプライマー二量体以外の増幅生成物をもたらさなかった。

【0076】レーン6～9において見られるように、hTERT mRNAの発現の定量に基づいたテロメラーゼ活性の推計は、前記試料中のmRNA画分のみが活性hTERTタンパク質をコードするので、正確ではないだろう。更に、β欠失スプライス変異体に相当する、前記の最小の生成物は、最も効率的に増幅し、そして競合的に、活性hTERTタンパク質をコードするmRNAを含む、より大きな2つのフラグメントの増幅を阻害する。この競合のため、ゲル電気泳動又は適当なプローブ解析のいずれかで、上述した様に増幅し、そして選択的に完全長のmRNAから生じた生成物の量のみを測定す

SYC1097 (配列番号4)

【0080】前記の上流プライマー、SYC1076 (配列番号2) は、エキソン6内の2309～2325位の配列にハイブリダイズする。前記の下流プライマー、SYC1097 (配列番号4) は、エキソン8内の2489～2506位の配列にハイブリダイズする。これらのプライマーは一緒に、完全長のhTERT mRNA配列に由来する198ヌクレオチド生成物の増幅を触媒する。

【0081】増幅及びゲル解析

として別のレーンに含めた。

【0072】結果

結果を図1に示す。レーンの割り当てを、以下の表に与える。

ることによって、hTERT mRNAの発見を定量する方法は、活性hTERTタンパク質をコードするmRNAの、信頼できない測定を提供するだろう。この予測不可能なことは、以下の例に記載する様に、活性hTERTタンパク質をコードするhTERT mRNAのみを選択的に増幅することによって排除することができる。

【0077】例3

20 活性hTERTタンパク質をコードするmRNAの選択的な増幅

活性hTERTタンパク質をコードするmRNAの選択的な増幅は、以下に記載する様に、エキソン6及びエキソン8内の領域に、それぞれハイブリダイズするプライマーを用いて行った。

【0078】試料：増幅は、以下の試料を用いて行った：

1. hTERTポジティブコントロールmRNAの連続希釈溶液。
2. 例1に記載の様に調製した、前立腺ガンの細胞系 (LNCaP) 由来の、100ngの全RNA
3. 例1に記載の様に調製した、白血病細胞系 (K562) 由来の、100ngの全RNA。
4. ヒト胸腺細胞 (Clonotech (Palo Alto, CA)) 由来の、100ngの全RNA。

【0079】増幅プライマー

前記hTERT mRNAの領域の増幅は、上述した上流プライマーSYC1076 (配列番号2) を、5' から3' の配向で示す、以下の下流プライマーと一緒に用いて行った：

40 5' -GGCGTGGTGGCACATGAA-3'

増幅は、例2に記載した様に行い、これは、3mMのMn(OAc)₂ を反応混合液中で使用し、そして逆転写を60℃で行ったことを除く。反応生成物は、ゲル中の別のレーンにおける第2番目のサイズのラダー (100塩基対のラダー、Life Technologies, Rockville, MD) の更なる含有と共に、例2に記載した様に解析した。

【0082】結果：結果を図2に示す。レーンの割り当てを、以下の表に提供する：

レーン	試料
1	pBR322/Msp1分解ラダー
2	100塩基対のラダー
3, 4	2×10^6 コピーのhTERTポジティブコントロールRNA
5, 6	2×10^5 コピーのhTERTポジティブコントロールRNA
7, 8	2×10^4 コピーのhTERTポジティブコントロールRNA
9, 10	2×10^3 コピーのhTERTポジティブコントロールRNA
11, 12	100ngのLNCaP RNA
13, 14	100ngのK562 RNA
15, 16	100ngの胸腺RNA
17, 18	鋳型無しのコントロール

【0083】レーン3～14に見られる様に、全ての試料の増幅が、予想される198ヌクレオチドの生成物に相当する、単一の生成物をもたらした。

【0084】本段落及び例2に記載の反応は、本質的に反応が、生成物の蓄積におけるプラトーに達するまで行った。従って、最初の標的数の定量的な推計を提供するよりもむしろ、得られた生成物の量は、例えば別の標的の競合的な増幅によって、阻害が起こらない限り、投入時の標的数にもかかわらず、比較的一定であることが予想されるだろう。小さい、 β 欠失のスプライス変異体の優先的な増幅による、完全長のhTERT mRNAの増幅に対する競合阻害の作用は、図1において、レーン2～5の、完全長のhTERT mRNAに相当するバンドの強度を、レーン6～9のものと比較することで見ることができる。対照的に、活性hTERTタンパク質に相当する完全長のmRNAの増幅に由来する、図2で見られる本質的に均一のバンドの強度は、競合阻害が無いことを示している。本発明のプライマーを用いて得られる、均一の増幅効率は、たとえ短いスプライス変異体を含む試料由来であっても、本発明のプライマー及び方法の利点を示す。本発明のプライマーによって与えられるこの均一性は、以下の例に記載の定量方法で使用する場合に、より一致した及び正確な定量的推計をもたらす。

【0085】例4

SYC1118 (配列番号5)

【0088】前記の上流プライマー、SYC1118 (配列番号5) は、エキソン6内の2311～2325位の配列にハイブリダイズする。前記の下流プライマー、SYC1097 (配列番号4) は、エキソン8内の2489～2506位の配列にハイブリダイズする。これらのプライマーと一緒に、完全長のhTERT mRNA配列の β 領域を含む、196塩基対の生成物の増幅を触媒する。

【0089】SYC1118 (配列番号5) の3' 末端ヌクレオチドは、3' 末端ヌクレオチドへのp-ter

CS12 (配列番号6) 5' -TCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGG-3'

【0091】前記のTaqMan形式での検出を可能にするために、前記プローブを2つの蛍光染料で標識し

hTERT mRNAの定量：TaqMan形式

この例は、TaqMan形式における、hTERT mRNAの定量を記載する。

【0086】試料

増幅は、以下の試料を用いて行った。全ての試料を、例1に記載の様に調製した。

1. hTERTポジティブコントロールmRNAの連続希釈溶液。
2. 200ngの、HT1080細胞系由来の全RNA。
3. 200ngの、HeLa細胞系由来の全RNA。
4. 200ngの、HuVec細胞系由来の全RNA。
5. 200ngの、SW480細胞系由来の全RNA。
6. 200ngの、LNCaP細胞系由来の全RNA。
7. 200ngの、腎臓293細胞系由来の全RNA。
8. 200ngの、K562細胞系由来の全RNA。
9. 200ngの、WIN細胞系由来の全RNA。

本件の細胞系試料は、テロメラーゼ活性を発現することが知られている公知の不死化細胞に由来し、ここで例外として、WIN細胞系は、テロメラーゼ活性を欠くことが知られている不死化細胞である。

【0087】増幅プライマー及び検出プローブ

hTERT mRNAの領域の増幅は、5' から3' の配向を示す、以下の上流プライマーを、上述した下流プライマーSYC1097 (配列番号4) と一緒に用いて行った。

5' -TGGGCACGTCCGCAA-3'

t-ブチルベンジル基の共有結合的な付着によって修飾され、ここで、これは引用によって本明細書に組み入れられる、欧州特許出願第866, 071号に記載されている。

【0090】検出は、以下に5' から3' への配向で示す、CS12 (配列番号6) を用いて行った。このプローブは、2427～2456位のhTERT遺伝子配列にハイブリダイズし、これらはエキソン7と8との間のスプライス部位にまたがっている。

た。前記プローブは、商業的に入手可能なホスホルアミダイト (Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いて、末端

のリン酸を介して5'末端に結合したCy 5蛍光団を含ませるために合成した。フルオレセイン (FAM) 標識は、ヌクレオチド829との間の内部部位に、BioGenex (San Ramon, CA) からホスホルアミダイトとして商業的に入手可能な標識リンカーを用いて組込んだ。生じたプローブは、ハイブリダイズしない状態の場合に、自己消光する。DNAポリメラーゼによる前記プローブの伸

C S 1 (配列番号7) 5' -CAGCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCCTACG-3'

C S 3 (配列番号8) 5' -TCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATG-3'

【0093】増幅

各々のPCR増幅は、100μlの合計反応液量で行った。最終試薬濃度を以下の様にした：

試料RNA

50mM Bicine, pH 8.2

125mM KOAc

8%グリセロール

3mM Mn(OAc)₂

200μM dATP, dGTP, dCTP

400μM dUTP

200nM 各プライマー

100nM プローブ

1% DMSO

サーマルサイクリングの時間及び温度

反応前のインキュベーション： 50℃で2分間

95℃で1分間

逆転写： 60℃で30分間

60サイクル： 変性： 95℃で20秒間

アニール／伸長： 60℃で30秒間

最終伸長及び維持： 72℃

【0097】定量的TaqMan解析

TaqMan反応において、前記DNAポリメラーゼの、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性は、増幅の間に、前記標的配列にハイブリダイズするプローブを開裂し、その結果、標識プローブフラグメントを、反応混合液中に放出する。完全な状態で自己消光する、前記プローブの開裂は、消光物質と蛍光団との分離、並びに前記蛍光団の蛍光の増大をもたらす。

【0098】増幅生成物の蓄積は、反応液の蛍光の増大を測定することによって、反応の間の各サイクルごとに測定した。各々の増幅サイクルの間、前記プローブは、前記蛍光団の最大の励起に近い波長の光で励起し、そして前記蛍光団の発光は、その発光の最大付近で測定される。これらの周波数は、GeneAmp (商標) 5700配列検出システムであらかじめ決定され；別のサーマルサイクラーを使用したならば、適当な周波数を選択すべきである。

【0099】蛍光測定値は、反応の初期のサイクルの間に得た、初期の蛍光測定値と分けることで標準化し、一方、サイクルの間の蛍光測定値は、比較的一定の様である。初期の蛍光測定値のために選択したサイクル数は、

長を、増幅の間防ぐために、前記プローブは、Glenn Research (Sterling, VA) から商業的に入手可能なホスホルアミダイトを用いての3'リン酸ブロックで合成した。

【0092】あるいは、以下のプローブのいずれかを、上述した様に使用し、標識し、そして修飾することができる：

10 2ユニット UNG'

10ユニット rTth DNAポリメラーゼ'

Hoffmann-La Roche によって開発及び製造をされて、そしてPerkin Elmer (Norwalk, CT) から入手可能なもの。

【0094】好ましくは、1% DMSOを反応混合液に加える。臭化エチジウムは、ゲル解析を容易にするために反応液に含め、そして、通常省いてもよい。

【0095】増幅反応は、GeneAmp (商標) 5700配列検出システム (PE Biosystems, Foster City, CA) で行い、使用した特異的な温度周期のプロファイル

を以下に示す。

【0096】

30 比較した全ての反応で同一であり、その結果、全ての測定値が同一の反応サイクルに関しての増大を表わす。

【0100】前記反応間の差異を定量するために、結果は、前記蛍光が任意蛍光レベル (AFL) を越えるまで行われた、増幅サイクル数に置き換えて表した。前記AFLは、基準線の蛍光レベル付近で選択されるが、測定される蛍光の無作為な変動範囲以上であるので、そのために反応速度は増幅の幾何学的な増殖期の間測定した。前記の増幅の幾何学的な増殖期の間、特定の限界値に達するのに必要なサイクル数は、最初の標的コピー数の対数に比例する。後期のサイクルにおける増幅生成物の蓄積は、反応を阻害し、そしてついには反応のプラトーをもたらす。

【0101】1. 12のAFLを、全ての反応に選択した。PCRの増幅が別々のサイクルから成り、そして蛍光測定がサイクル当たり1回行われるので、測定した蛍光は典型的に、前記のAFL以下から、単一のサイクルにおけるAFL以下まで増大する。前記測定の正確性を向上させるために、本明細書ではC_T値として言及する、AFLの限界に達するための「厳密な」サイクル数は、サイクル間に蛍光測定をはさむことで計算した。

【0102】結果：各試料で得たC_T 値を、以下の表に示す。各C_T 値は、2回の反応から得た平均値を表わし、但し10コピーのコントロールの増幅は除く。前記10コピーのコントロールの、2回の複製増幅のうち1回だけが、検出可能な生成物をもたらした。前記増幅生成物のゲル解析（示さなかった）は、上述した様に別々に行い、これらは第2回目の反応がプライマー二量体に

相当する生成物を生成したことを示した。第2回目の10コピー反応における生成物の欠如は、標的コピー数の推計が不正確であることによる、初期の試料における標的の事実上の欠如か、あるいはプライマー二量体の競合的な増幅のいずれかによってもたらされたのであろう。

【0103】

コントロール試料

試料	C _T 値
10 ⁵ コピーのhTERTポジティブコントロール	26.83
10 ⁴ コピーのhTERTポジティブコントロール	30.15
10 ³ コピーのhTERTポジティブコントロール	33.57
10 ² コピーのhTERTポジティブコントロール	36.84
10コピーのhTERTポジティブコントロール	41.28

【0104】

ヒト細胞系試料

試料	C _T 値
200ngのHT1080細胞系	30.95
200ngのHeLa細胞系	34.53
200ngのHuVec細胞系	39.35
200ngのSW480細胞系	33.36
200ngのLNCaP細胞系	31.68
200ngの293細胞系	31.01
200ngのK562細胞系	32.58
200ngのWIN細胞系	—

【0105】標準曲線は、知られている量のhTERT mRNAポジティブコントロールの鋳型の増幅から得た、C_T 値から導いた。標準曲線は、例えば、投入コピー数とC_T 値との間の、対数の関係を表す一次方程式に、前記のデータをはめ込むことで得られる。具体的に、前記のデータは以下の方程式にはめ込んだ：

$$\log(N_0) = \log(N_{AFL}) - \log(R) \cdot C_T$$

（ここで、N₀ は最初のコピー数であり、N_{AFL} は、AFLに相当するコピー数に等しい定数であり、Rは、各増幅サイクルの効率に等しい定数であり、そしてlog(X)は、Xが10の底を表す対数である）。一次方程式にデータをはめ込むための、例えば最小二乗法によるアルゴリズムは公知であり、そして多くの統計学ソフトウェアパッケージ及びスプレッドシートプログラムに含まれる。

【0106】前記のコントロール試料から得たC_T 値から、以下の標準曲線を得た：

$$\log(N_0) = 44.411 - 3.559 \cdot C_T$$

【0107】前記細胞系試料のそれぞれの、投入時のコピー数の計算は、知られているコントロールの鋳型から作製した標準曲線を用いて行った。典型的に、mRNAの濃度は注目の数値であり、これは、計算したコピー数を、試料のサイズで割ることで得られる。

【0108】上述した標準曲線を用いて、hTERT

mRNAの濃度（全RNAのng当たりの、hTERT mRNAのコピー数）は、前記の組織試料のそれぞれに対して計算した。結果を以下に示す。

【0109】

計算したhTERT濃度（コピー数/ng）

試料	hTERT濃度
200ngのHT1080細胞系	29.81
200ngのHeLa細胞系	2.87
200ngのHuVec細胞系	0.13
200ngのSW480細胞系	6.13
200ngのLNCaP細胞系	18.46
200ngの293細胞系	28.65
200ngのK562細胞系	10.26
200ngのWIN細胞系	0.00

【0110】試料RNA量の変化性のための補正

計算したhTERT mRNAの濃度の正確性は、前記アッセイで使用する全RNAの測定の正確性に影響を受けやすい。投入時の全RNAにおける試料間の変化性は、計算した濃度の変化性の増大をもたらし、これはテロメラーゼ活性によって、補正の統計的な有意性を弱められる傾向にあるだろう。典型的に、及び上述した様に、反応で使用するRNAの合計量は、前記RNA試料の光学密度に基づいて測定される。このことが更に、前記試料中の細胞数の、適当な測定を与えるのは、細胞当たりのRNAの合計量が、比較的一定であることが知られているためである。hTERT mRNAの定量の精度を最大限に高めるために、全RNAの精密な定量的測定が、光学密度によるもの以上であることが望ましい。更に、前記アッセイを行う前に、光学密度でRNAの合計量を測定することは、利用可能な試料が少量であるような、特に臨床上の試料を用いる場合に適していないだろう。

【0111】前記試料中の全RNA量の推計は、コントロールとして、その組織型の全ての細胞において、一定のレベルで発現する、別の遺伝子の発現を別々に測定することで向上させることができる。全RNAの推計は統

いて、予想される発現に関連する、コントロール遺伝子の発現の測定に基づいて調整される。同様に、測定した h T E R T m R N A の濃度は、予想される発現に関する、コントロール遺伝子の発現の測定に基づいて調整される。

【0112】 適当なコントロール遺伝子の選択は、本発明の必須の観点ではない。適当なコントロール遺伝子は、正常及びガン性細胞、その両方で、一定の、測定可能なレベルで発現するものである。候補遺伝子は、前記文献において知られており、そして経験的に機械的な作業でスクリーニングすることができる。典型的に、候補遺伝子は“ハウスキーピング”遺伝子から選択され、この発現生成物は前記細胞の基本的な代謝に必須であり、そしておだやかな又は高い、一定のレベルで発現する。1つの特定の例を、本明細書に記載する。

【0113】 前記コントロール遺伝子 m R N A のコピー数は、典型的に、h T E R T m R N A のコピー数を測定するために使用する試料のアリコートを用いて、別々の反応で定量される。しかしながら、どちらの m R N A の定量もまた、例えば識別可能な染料で標識したプローブを用いる、単一の反応で行うことができる。

【0114】 前記コントロール遺伝子 m R N A のコピー数を計算した後、測定した全 R N A の量は、次の式に従い、より正確な値を提供するために調節することができる：

調節した全 R N A = 測定した全 R N A * (コントロール #) / (予想されるコントロール #)、

(ここで、前記の測定した全 R N A は、光学密度から得られる初期値を意味し、(コントロール #) は測定したコントロール遺伝子 m R N A のコピー数であり、そして (予想されるコントロール #) は、元の試料サイズの試料において予想される、コントロール遺伝子 m R N A のコピー数である)。同じく、調節した h T E R T m R N A の濃度は、次の式に従って計算される：

H A 3 0 0 (配列番号 9) 5' -CAATGCCAGTGGAAACCA-3'

H A 2 9 9 (配列番号 10) 5' -CCATACCGGGTTGAGAACA-3'

【0118】 前記 E F 1 A の m R N A の定量は、以下の例 6 に記載のプローブ無しの反応的 P C R 法を用いて、そこに記載の条件を用いて、しかし上文のプライマーによって行った。前記の h T E R T コントロールから作製した標準曲線は、前記 E F 1 A のコピー数を計算するために使用した。予想される E F 1 A のコピー数は、各反応において観察される平均コピー数として推計した。

【0119】 前記の調節した h T E R T 濃度 (h T E R T m R N A コピー数 / 全 R N A の ng) を以下の表に示す。

調節した h T E R T 濃度 (コピー数 / ng)

試料	h T E R T 濃度
200 ng の H T 1 0 8 0 細胞系	25.35
200 ng の H e L a 細胞系	7.38

調節した [h T E R T] = [h T E R T] * (予想されるコントロール #) / (コントロール #)、

(ここで、[h T E R T] は h T E R T m R N A の濃度を意味する)。

【0115】 好ましくは、前記ハウスキーピング遺伝子の発現の定量における使用のための、別々の標準曲線は、知られているコピー数の一連の試料から作製される。しかしながら、前記 h T E R T m R N A 及び前記コントロール遺伝子 m R N A の発現効率が類似しているならば、前記 h T E R T m R N A の標準曲線は、前記コントロール m R N A を定量するために使用することができる。その結果、推計のコピー数は典型的に、定数乗法的因子によって、前記コントロール遺伝子の発現から作製した標準曲線を用いて得られるであろう推計と異なるだろう。しかしながら、前記の発現したコントロールの値及び前記の測定したコントロールの値、その両方が、同一の乗法的因子によるそれらの“補正”値と異なることがあるので、前記の h T E R T m R N A の濃度を調整するのに使用する比率は変化しない。前記コントロール反応の発現効率は、類似のサイズの領域を増幅するプライマーを選択して、そして効率的な発現のためのプライマー対をスクリーニングすることによって、前記 h T E R T の発現効率に適合することができる。

【0116】 前記の計算した h T E R T 濃度は、ハウスキーピング遺伝子、E F 1 A (延長因子 1 - α) の発現に基づいて調整した。予備的なスクリーニングは、E F 1 A が正常及びガン性組織、その両方で比較的一定のレベルで発現することを示した。

【0117】 前記の E F 1 A m R N A の配列は、受託番号 X 0 3 5 5 8 のもと、ジーンバンクから入手可能である。前記 E F 1 A の領域を増幅するために使用するプライマーは、5' から 3' への配向を示す次のものに与えられる：

200 ng の H u V e c 細胞系	0.22
200 ng の S W 4 8 0 細胞系	7.23
200 ng の L N C a P 細胞系	16.28
200 ng の 2 9 3 細胞系	38.34
200 ng の K 5 6 2 細胞系	9.16
200 ng の W I N 細胞系	0.00

【0120】 例 5

テロメラーゼ活性の推計

テロメラーゼ活性を推計するための、前記 h T E R T m R N A の発現を用いる有用性は、前述の例に記載の試料を用いて研究した。テロメラーゼ活性を測定するために使用した試料は、前記 h T E R T m R N A の濃度を測定するための前述の例において使用した、同一の細胞系試料のアリコートであった。調節した h T E R T m

RNAの濃度は、前述の例に報告されている。

【0121】前記試料に存在するテロメラーゼ活性は、引用によって本明細書に組入れられる、Chang, 1999, PCR Applications (Innis et al., eds) Chapter 17, Academic Press, San Diego に記載の反応的TRAPアッセイを用いてアッセイした。

【0122】引用によって本明細書に組入れられる、米国特許第5,629,154号に記載の前記TRAPアッセイにおいて、テロメラーゼ反復単位を欠くテロメラーゼの基質が、適当な緩衝液中の、細胞抽出物のアリコートに加えられる。前記細胞抽出物に存在するテロメラーゼ活性は、前記基質へのテロメラーゼ反復単位の付加をもたらし、伸長した基質は、続いて前記反復単位に特異的な第1のプライマー及び前記のテロメラーゼ基質が過剰である第2のプライマーから成るプライマー対で増幅させ、そして増幅生成物をゲル電気泳動で解析することで検出する。

【0123】上文のChang, 1999 に記載の反応的TRAPアッセイは、前記の伸長したテロメラーゼ基質の増幅が、上文(下文も参照のこと)のHiguchi and Watson, 1999に記載の反応的PCR法を用いて行われる、前記TRAPアッセイの定量版であり、これはテロメラーゼによって伸長するテロメラーゼ基質の定量法を可能にする。初期のテロメラーゼ伸長反応は、25℃で10分間行う。結果を較正するために、標準曲線は、合成鋳型の連続希釈溶液の別々の増幅から、同一のプライマーを用いて作製する。伸長したテロメラーゼ基質の増幅から得た C_T 値は、合成鋳型の初期のコピー数(又は、同じくは濃度)を計算するために使用し、これは同一の C_T 値をもたらし得る。従って、前記の反応的TRAPアッセイは、合成鋳型の初期濃度として表わされる、テロメラーゼ活性の定量的測定を提供する。

【0124】各試料の、前記テロメラーゼ活性及び調節したhTERT mRNAの濃度の散布プロットを、図3に示す。図3の視覚的な検分から明らかな様に、データは、前記のテロメラーゼ活性が前記hTERT mRNAの濃度に対して、一次従属的に関係していることを強く示している。

【0125】前記の調節したhTERT mRNAの濃度からの、テロメラーゼ活性の最も適合する線型予測は、最小二乗法によって計算した。前記の線型予測は、以下の方程式に記載した：

$$\text{テロメラーゼ活性} = C_1 \cdot [\text{hTERT}] + C_2$$

(ここで $C_1 = 2.8755$ であり、そして $C_2 = -6.2037$ である)。

【0126】前記の C_2 値は、hTERT mRNAが無い、例えばゼロであることが予想される様な濃度に相当するテロメラーゼ活性を表す。得やすい、負の C_2 は、統計的な人工のものである。しかしながら、負の C_2 はまた、測定したテロメラーゼ活性の、hTERT

mRNAの濃度に対する依存性が、低濃度で線型ではないが、限界の事象を示すならば、もたらされるだろう。予測した線の、正の“X切片”(2.1574)は、テロメラーゼ活性が、この特定の活性アッセイを用いて検出できない様な、限界のmRNA濃度以下であるとして解釈することができる。

【0127】ピアソンの積モーメント相関係数の二乗は、 $r^2 = 0.9614$ となるように計算した。前記の r^2 値は、前記hTERT mRNAの濃度で説明できる、テロメラーゼ活性における分散の端数として解釈することができる。96%以上の r^2 は、前記hTERT mRNAをテロメラーゼ活性の予測として用いることが、テロメラーゼ活性の正確な測定を提供することを示す。

【0128】使用した特定のテロメラーゼ活性アッセイが、本発明の必須の部分ではないことは明らかであるだろう。例えば、同様のテロメラーゼ活性アッセイは、引用によって本明細書に組入れられる、Gelmini et al., 1998, Clinical Chemistry 44 (10) : 2133-2138に記載されている。他のテロメラーゼ活性アッセイを使用するために、相似の実験が行われ、hTERT mRNAの濃度からの、テロメラーゼ活性の最も適合する線型予測が計算される。使用したアッセイで定義されるユニットで表したテロメラーゼ活性は、続いて、計算した予測の相似を用いて、前記hTERT mRNAの濃度から推計される。

【0129】例6

hTERT mRNAの定量：反応的PCR形式

この例は、プローブ無しの“反応的PCR”形式を用いる、hTERT mRNAの定量を記載し、ここで、これは本質的に上文のHiguchi and Watson, 1999, PCR Applications, Chapter 16に記載されている様なものである。

【0130】増幅は、好ましくは、反応液中で臭化エチジウム又はSYBR (商標) Green I (Molecular Probes, Eugene, OK) のいずれかを用いて行われる。どちらの染料も二本鎖DNAへの挿入によって、それらの蛍光を増大する。増幅が二本鎖生成物の合成をもたらし、生成物の量の増大は反応の蛍光における増大をもたらし。

【0131】臭化エチジウムを用いる増幅は本質的に、前記TaqManアッセイのための上文に記載の反応条件を用いて行われ、しかし前記反応に加えるのは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の臭化エチジウムであり、そして前記のプローブは使用しない。SYBR (商標) Green Iを用いる増幅は本質的に、前記のものと同様に行われるが、DMSO中で希釈した $0.2 \times \text{SYBR (商標) Green I}$ ($10,000 \times$ として販売されている)を用いる。

【0132】SYBR (商標) Green Iを用いる反応は、Gene Amp (商標) 5700配列検出システ

ム (PE Biosystems, Foster City, CA) を用いて、前記の TaqMan アッセイで上述した同一のサーマルサイクリング条件を用いて行う。前記の GeneAmp (商標) 5700 配列検出システムは、SYBR (商標) Green I を用いる使用のために設計され、そして励起及び検出の波長は、この染料のためにあらかじめ設定されている。臭化エチジウムを用いる反応は、ABI PRISM (商標) 配列検出システム (PE Biosystems, Foster City, CA) を用いて行われ、これは適当な検出波長の選択を行う。

【0133】増幅生成物の蓄積は、上述した TaqMan 反応の様に、各サイクルで染色蛍光を測定することによって、反応中監視される。試料のコピー数の定量的な推計を提供するための、蛍光データの解析は、本質的に上文の TaqMan アッセイで記述した様に行われる。

【0134】例7

前立腺ガンの臨床的組織における hTERT mRNA の発現

hTERT mRNA の発現の定量は、R1～R9 で表される、9つの異なる個体の、前立腺の生検を用いて行った。組織の状態は、病理学者によって分類された。

【0135】単一の組織試料は、個体 R1～R4 から採取した。個体 R1 及び R2 由来の組織試料は、正常な組織として分類された。個体 R3 及び R4 由来の組織試料は、腫瘍組織として分類した。対となる腫瘍及び“正常”の生検は、個体 R5～R9 から採取した。前記の“正常”な試料は、前記の腫瘍に隣接している前立腺の領域から切除した。200ng の全 RNA の試料は、本質的に例1に記載の前立腺の生検から調製した。

【0136】更に、商業的に入手可能なヒト前立腺の全 RNA の 200ng 試料 (Clontech, Palo Alto, CA) は、ネガティブコントロール (以降、“NC”と表す) として解析した。前記の商業的に入手可能な前立腺の全 RNA は、提供者によって正常な組織由来であるとして同定された。

【0137】定量は、上述した TaqMan アッセイを用いて行った。前述の例に記載の様に、10倍で連続希釈した hTERT ポジティブコントロール試料の増幅を行い、標準曲線を作製した。初期の hTERT mRNA の濃度の推計は、上述の、別々に測定した EF1A mRNA の濃度に基づいて調節した。

【0138】結果を、以下の表、及び図4に与える。前記の同一の個体由来 (すなわち、個体 R5～R9 由来) の正常組織及び腫瘍組織の試料から得た、前記 hTERT

TmRNA の濃度の、図4における比較を容易にするために、2つの値を並べて示す。

hTERT mRNA 濃度 (コピー数/ng)

試料	正常細胞	腫瘍細胞
NC	0.21	—
R1	0.17	—
R2	0.00	—
R3	—	1.96
R4	—	1.53
R5	0.37	3.75
R6	0.12	6.57
R7	0.49	2.26
R8	0.47	5.68
R9	0.40	5.92

【0139】前記のネガティブコントロール試料 (商業的に入手可能な正常前立腺組織) は、低い、基底レベルの hTERT mRNA の発現を示した。同様に、前記の正常前立腺組織は、低い、基底レベルの hTERT mRNA の発現を示し、但し R2 は hTERT mRNA の発現をしなかった。

【0140】対照的に、全てのガン性前立腺組織の試料は、有意に上昇したレベルの hTERT mRNA の発現を示した。前記のガン性組織試料において観察される hTERT mRNA の発現の範囲は、正常な試料において観察される hTERT mRNA の発現の範囲と重複しなかった。このことは、hTERT mRNA の発現レベルが、正常組織からガン性のものを識別するために使用することができることを示す。

【0141】正常組織からガン性のものを識別するために、しきい値は、正常試料において観察される、最大の hTERT mRNA 発現以上であり、そしてガン性組織において観察される、最小の hTERT mRNA の発現以下であることが選択される。前記のしきい値以上の hTERT mRNA の発現を有する組織は、ガン性であるとして同定される。いくつかのガン性組織が、特にガン性になる初期のものと出会うであろうことが予想され、ここで、前記の hTERT mRNA の発現は、正常な発現レベルのしきい値を超えないであろう。前記の試験の感度を最大化するために、前記のしきい値は出来る限り低く選択し、一方、更に正常組織における hTERT mRNA の発現範囲を含むべきである。

【0142】

【配列表】

【表4】

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Quantitation of hTERT mRNA Expression

<130> 535600JP

<140>

<141>

<150> US 465,491

<151> 1999-12-16

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4015

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcagcgctgc gtccctgtgc gcacgtggga agccctggcc ccggccaccc ccgcgatgcc 60
gcgcgctccc cgctgcccag cgtgtccgtc cctgtctgcg agccactacc gcgaggtgct 120
gccgctggcc acgttctgtc ggcgcctggg gcccagggcc tggcggctgg tgcagcgccg 180
ggaccocggcg gctttccgcg cgctggtggc ccagtgcctg gtgtgctgac cctgggacgc 240
acggccgccc ccgcgcgcgc cctccttccc ccaggtgtcc tgccctgaag agctggtggc 300
ccgagtgctg cagaggtgtg gcgagcgccg ccggaagaa gtgctggcct tcggcttcgc 360
gtgtgctggac ggggcccgcg ggggcccccc cgaggccttc accaccagcg tgcgcagcta 420
cctgcccac acggtgaccg acgcactgcg ggggagcggg gcgtgggggc tgctgctgcg 480
ccgcgtgggc gacgacgtgc tggttcacct gctggcacgc tgcgcgctct ttgtgctggc 540
ggctcccagc tgcgcctacc aggtgtgccc gccgcgcgtg taccagctcg gcgctgccac 600
tcaggcccg ccgcgcgcac acgctagtgg accccgaagg cgtctgggat gcgaacgggc 660
ctggaaacct agcgtcaggg aggccggggg cccctggggc ctgcccagcc cggtgctgag 720
gaggcgccgg ggcagtgcca gccgaagtct gccgttgccc aagaggccca ggcgtggcgc 780
tgccctgag ccggagcgga cgcgcgttgg gaagggttcc tgggcccacc cgggcaggac 840
gcgtggaccg agtgaccgtg gttctgtgt ggtgtcacct gccagaccgc ccgaagaagc 900
cacctctttg gagggtgcgc tctctggcac gcgccactcc caccctccg tgggcgcgca 960
gcaccacgcg ggccccccat ccacatcgcg gccaccagct ccttgggaca cgccttgtcc 1020
cccggtgtac gccgagacca agcaactcct ctactcctca ggcgacaagg agcagctgcg 1080
gccctccttc ctactcagct ctctgagggc cagcctgact ggcgctcgga ggctcgtgga 1140
gaccatcttt ctgggttcca ggccctggat gccagggaact ccccgaggt tgcccgcct 1200
gccccagcgc tactggcaaa tgcggccctt gttcttgag ctgcttggga accacgcgca 1260
gtgcccctac ggggtgtctc tcaagacgca ctgcccgtcg cagctgcgg tcaccccaac 1320
agccggtgtc tgtgcccggg agaagcccca gggctctgtg gcggcccccg agggaggaga 1380
cacagacccc cgtcgcctgg tgcagctgct ccgccagcac agcagccctt ggcaggtgta 1440
cggcttcgtg cgggcctgcc tgcgcgggct ggtgccccca ggcctctggg gctccaggca 1500
caacgaacgc cgttctctca ggaacaccaa gaagttcact tccctgggga agcatgccaa 1560
gctctcgtg caggagctga cgtggaagat gagcgtgcgg gactgcgctt ggctgcgcag 1620
gagccacggg gttggctgtg ttccggccgc agaqcacccg ctgctgagg agatcctggc 1680
caagttcctg cactggctga tgggtgtgta cgtcgtcgag ctgctcaggt ctttcttcta 1740
tgtcacggag accacgtttc aaaagaacag gctctttttc taccggaaga gtgtctggag 1800
caagttgcaa agcattggaa tcagacagca cttgaagagg gtgcagctgc gggagctgtc 1860
ggaaagcagag gtcaggcagc atcgggaagc caggcccgcc ctgctgacgt ccagactccg 1920
cttcatcccc aagcctgacg ggctgcccgc gattgtgaac atggactacg tcgtgggagc 1980
cagaacgttc cgcagagaaa agagggccga gcgtctcacc tcgaggggta aggcactgtt 2040
cagcgtgtct aactacagac gggcgcgggc ccccgccctc ctgggcgcct ctgtgctggg 2100
cctggacgat atccacaggg cctggcgcac cttcgtgctg cgtgtgcggg cccaggaccc 2160
gccgcctgag ctgtactttg tcaagggtga tgtgacgggc gcgtacgaca ccatccccc 2220
ggacaggctc acggaggtca tcgcccagcat catcaaaccc cagaacacgt actgctgctg 2280
tcgggtatgcc gtggtccaga aggccgccea tgggcacgtc cgcaaggcct tcaagagcca 2340

```

【0143】

40 【表5】

39

40

```

cgtctctacc ttgacagacc tccagccgta catgcgacag ttcgtggctc acctgcagca 2400
gaccagcccg ctgagggatg ccgtcgtcat cgagcagagc tcctccctga atgaggccag 2460
cagtggcctc ttgcacgtct tcttacgctt catgtgccac cagcgcgtgc gcatcagggg 2520
caagtccctac gtccagtgc aagggtccc gcagggtccc atcctctcca cgtgctctg 2580
cagcctgtgc tacggcgaca tggagaacaa gctgtttgcg gggattcggc gggacgggct 2640
gctcctgcgt ttggtggatg atttcttgtt ggtgacacct caccctaccc acgcgaaaac 2700
cttcctcagg accctgggtcc gaggtgtccc tgagtatggc tgcgtggtga acttgcggaa 2760
gacagtgggt aacttccctg tagaagacga ggccctgggt ggcaaggctt ttgttcagat 2820
ggcggcccaac ggccctattcc cctggtgcgg cctgctgctg gataccggga ccttggagggt 2880
gcagagcgac tactccagct atgcccggac ctccatcaga gccagtctca ccttcaaccg 2940
cggcttcaag gctgggagga acatgcgtcg caaactcttt ggggtcttgc ggtggaagtg 3000
tcacagcctg tttctggatt tgaggtgaa cagcctccag acggtgtgca ccaacatcta 3060
caagatccct ctgctgcagg cgtacaggtt tcacgcagt gtgctgcagc tcccatttca 3120
tcagcaaggt tggagaacc ccacatrtt cctgcgcgtc atctctgaca cggcctccct 3180
ctgctactcc atcctgaaag ccaagcaacg agggatgtcg ctgggggcca agggcgccgc 3240
cggccctctg ccctccgagg ccgtgcagtg gctgtgccac caagcattcc tgcctaaagt 3300
gactcgacac cgtgtcacct acgtgccact cctgggttca ctcaggacag cccagacgca 3360
gctgagtcgg aagctcccgg ggacgacgct gactgccctg gagggccgag ccaaccgggc 3420
actgccctca gecttcaaga ccatcctgga ctgatggcca cccgccca caagggccga 3480
gagcagacac cagcagccct gtcacgccgg gctctacgct ccagggaagg agggcgccgc 3540
cacacccagg cccgcaccgc tgggagtcgt aggcctgagt gagtgtttgg ccgagggcctg 3600
catgtccggc tgaaggctga gtgtccggct gaggcctgag cagtggtcca gccaaagggt 3660
gagtgccag cacacctgcc gtcttcaatt cccacacagg tggcgctcgg ctccacccca 3720
gggccagctt ttctcacca ggagccggc ttccactccc cacataggaa tagtccatcc 3780
ccagattcgc cattgttcac ccctgcacct gccctccttt gccttccacc cccaccatcc 3840
aggtggagac cctgagaagg accctgggag ctctgggaat ttggagtga ccaagggtgtg 3900
ccctgtacac aggcgaggac cctgcacctg gatgggggtc cctgtgggtc aaattggggg 3960
gaggtgctgt gggagtaaaa tactgaatat atgagttttt cagttttgaa aaaaaa 4015

```

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
catgggcacg tccgcaa 17

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
cgccgaatcc ccgcaca 17

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ggcgtgggtgg cacatgaa 18

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
tgggcacgtc cgcaa 15

<210> 6
<211> 30

【0144】

40 【表6】

41

42

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
tcatcgagca gagctcctcc ctgaatgagg

30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cagcagtggc ctcttcgacg tcttctacg

30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
tctaccttga cagacctcca gccgtacatg

30

<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
caatgccagt ggaacca

17

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
ccataccggg ttgagaaca

20

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、例2に記載した様な、 β 領域の両側に存在するプライマーを用いて生成した、hTERT mRNAの増幅生成物のゲル解析の結果を示す。

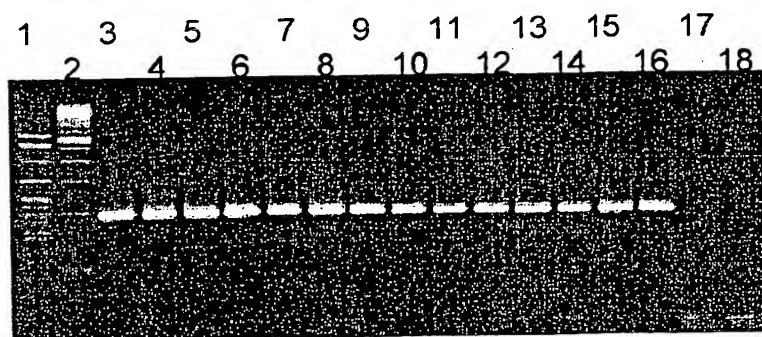
【図2】図2は、例3に記載した様な、本発明のプライマーを用いて生成した、hTERT mRNAの増幅生成物のゲル解析の結果を示す。

【図3】図3は、例5に記載した様な、hTERT mRNAの発現に関する、テロメラーゼ活性の散布プロットを示す。

【図4】図4は、例7に記載した様な、正常及びガン性の前立腺組織におけるhTERT mRNAの比較を示す。

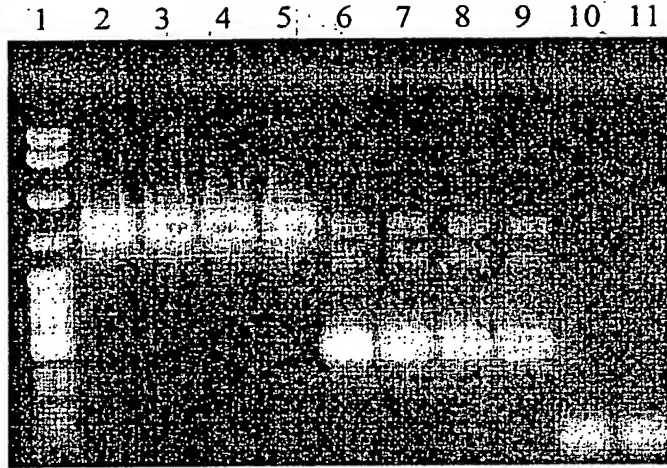
【図2】

図2

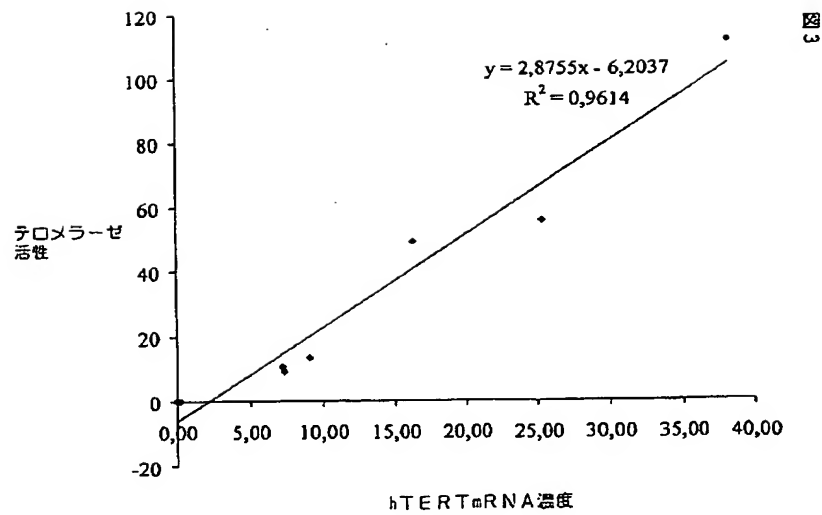


【図1】

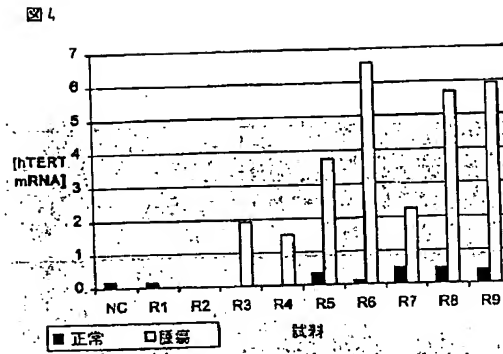
図1



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 クリストファー デビット サンティニ
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94611、
 オークランド、トゥウェンティナインス
 ストリート 260、アパートメント ナン
 バー 22